

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

3/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008229653

WPI Acc No: 1990-116654/199016

Detecting toxins using specific resistant or sensitive microorganisms -  
which carry plasmid encoding for heat induced bio-luminescence system,  
and opt. specific toxin related gene

Patent Assignee: GENLUX FORSCHUNGSGE (GENL-N)

Inventor: KOLEHMAINE S E; MOLDERS H H

Number of Countries: 014 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
-----------	------	------	-------------	------	------	------

DE 3833628	A	19900412	DE 3833628	A	19881003	199016 B
------------	---	----------	------------	---	----------	----------

WO 9004037	A	19900419	WO 89DE626	A	19891003	199019
------------	---	----------	------------	---	----------	--------

AU 8943352	A	19900501				199029
------------	---	----------	--	--	--	--------

Priority Applications (No Type Date): DE 3833628 A 19881003

Cited Patents: 2.Jnl.Ref; DE 284896; US 3370175; US 4581335; WO 8800617

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

WO 9004037	A			
------------	---	--	--	--

Designated States (National): AU FI JP US

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

Abstract (Basic): DE 3833628 A

Toxic substances (A) are detected in liq or gaseous environments using microorganisms of defined general or specific resistance or (hyper)sensitivity with respect to (A). The indicator strains used are (1) naturally occurring; (2) have been adapted to particular (A) by selection in the laboratory or have been provided with a gene involved in specific resistance/hypersensitivity, and (3) they have all been transformed with a bacterial luciferase gene complex to make them bioluminescent.

Specifically, step (3) is achieved with plasmid pGL3 having the following features: (1) the LUX gene complex of *Vibrio harveyi*, (2) a particular allele of the lambda phage repressor gene CI, under control of its natural promoter (PR); (3) ampicillin resistance gene; (4) a restriction site, allowing cloning of an additional gene; and (5) the lambda PRM promoter, for controlling the transcription of LUX.

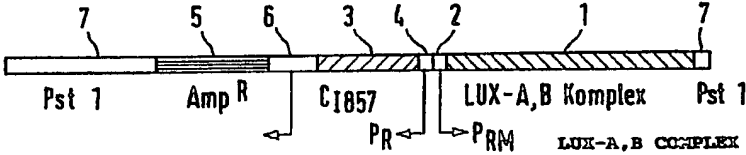
USE/ADVANTAGE - These organisms are used to detect eg antibiotics, heavy metals, enzyme inhibitor, pesticides, etc. They provide rapid (less than 2 hr) and very sensitive detection, and pGL3 can be incorporated into most sorts of microorganisms. The use of an inducible (rather than constitutive) bioluminescence system reduces the signal-to-noise ratio and limits the light emission to a brief period so that even slowly-growing organisms can be used. The method can be automated and is suitable for use away from laboratories. (6pp

Dwg.No.0/2)

Derwent Class: B04; C03; D16; J04

International Patent Class (Additional): C12N-015/00; C12Q-001/00

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b>  <b>C12Q 1/18, 1/66</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 90/04037  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. April 1990 (19.04.90)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE89/00626 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. Oktober 1989 (03.10.89)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 38 33 628.6      3. Oktober 1988 (03.10.88)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GEN- LUX FORSCHUNGSGESELLSCHAFT FÜR BIOLO- GISCHE VERFAHREN MBH [DE/DE]; Wallstraße 10, D-4050 Mönchengladbach 1 (DE).  <b>(72) Erfinder;und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> MÖLDERS, Horst [DE/ DE]; Hoeninger Straße 15, D-4047 Dormagen 11 (DE). KOLEHMAINEN, Seppo, E. [FI/US]; 12 Kyle Way, Marathon, FL 33050 (US).  <b>(74) Anwalt:</b> UMLAUF, Erich, O., E.; Postfach 60 08 08, D- 8000 München 60 (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (eu- ropäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>(54) Title:</b> PROCESS FOR DETECTING AND IDENTIFYING TOXIC SUBSTANCES BY MEANS OF CLONED MI- CRO-ORGANISMS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUM NACHWEIS UND ZUR IDENTIFIKATION TOXISCHER SUBSTANZEN MIT HILFE KLONIRTER MIKROORGANISMEN		
<div style="text-align: center;">  </div>		
<b>(57) Abstract</b>  <p>A process is disclosed for carrying out toxicity tests in fluid or gaseous phases by means of appropriate micro-organisms with a defined sensitivity or resistance to toxic substances. The toxins may be antibiotics, heavy metals, microbial toxins, impurities, pesticides, disinfectants, preservatives or other substances with an antimicrobial action. The strains of micro-organisms used in this process are provided with a plasmid vector which allows the enzyme luciferase to be synthesized in a heat-inducible, therefore controllable, manner. The degree of toxicity is expressed by changes in metabolism or by a reduction in the viability of the indicator organisms, which can be in turn measured quickly and with high sensitivity on the basis of bioluminescence signals, once the plasmid encoded production of luciferase is initiated. This new type of self-regulating plasmid vector allows sensitive and inexpensive bioluminescence measurements to be carried out with in principle any micro-organism. The process makes it possible to carry out biologically relevant tests for detecting a generally present toxicity and for identifying and determining the concentration of specific toxins by means of specially equipped micro-organisms.</p>		

### (57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren beschrieben, bei welchem mit Hilfe geeigneter Mikroorganismen definierter Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber toxischen Substanzen Toxizitätstests in flüssigen oder gasförmigen Phasen durchgeführt werden können. Die Toxine können Antibiotika, Schwermetalle, mikrobielle Toxine, Fremdstoffe, Pestizide, Desinfektionsmittel, Konservierungsstoffe oder andere Substanzen mit antimikrobieller Wirkung sein. Die Mikroorganismen-Stämme, welche in dem Verfahren verwendet werden, sind mit einem Plasmid-Vektor ausgestattet, der die Synthese des Enzyms Luciferase in einer hitzeinduzierbaren und somit kontrollierbaren Art und Weise ermöglicht. Das Ausmaß der Toxizität wird erfaßt als Veränderungen im Metabolismus oder dem Verlust der Lebensfähigkeit der Indikator-Organismen, die ihrerseits schnell und mit hoher Empfindlichkeit anhand von Biolumineszenz-Signalen nach Anschalten der plasmid-enkodierten Luciferase-Produktion gemessen werden. Der vorgestellte neue Typ eines sich selbst regulierenden Plasmid-Vektors erlaubt Durchführung sensitiver und unaufwendiger Biolumineszenz-Messungen mit prinzipiell jedem Mikroorganismus. Das Verfahren eröffnet die Möglichkeit zur Durchführung biologisch relevanter Tests sowohl auf Anwesenheit generell vorhandener Toxizität als auch die Identifikation und Konzentrationsbestimmung spezifischer Toxine bei Verwendung speziell ausgerüsteter Mikroorganismen.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

- 1 -

## Verfahren zum Nachweis und zur Identifikation toxischer Substanzen mit Hilfe klonierter Mikroorganismen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis toxischer Substanzen in einer flüssigen oder gasförmigen Umgebung mit Hilfe spezifisch sensitiver und/oder resistenter Mikroorganismen-Stämme, welche

1. natürlicherweise vorkommen,
2. durch wiederholte Labor-Selektion an bestimmte toxische Substanzen adaptiert oder
3. durch molekulare Klonierung mit bestimmten Eigenschaften ausgestattet worden sind.

Dabei sind alle Mikroorganismen durch Einführen eines plasmid-inkodierten Luciferase-Gens zur Emission von Licht (Biolumineszenz) befähigt. Die Biolumineszenz der Indikatororganismen ermöglicht, schnell und mit großer Empfindlichkeit Änderungen in ihrem Metabolismus oder den Verlust ihrer Lebensfähigkeit als Auswirkung einer toxischen Substanz im Testmedium zu erfassen.

### Beschreibung bereits bekannter Meßverfahren mit Hilfe von Mikroorganismen

Die Verwendung von Mikroorganismen zur Messung kritischer Belastungen durch toxische Substanzen (US-PS 3 981 777) sowie zur Bestimmung von Antibiotika-Konzentrationen (EP. No. 0200 226) ist etabliert. Bei den Anwendungen liegt die Erfassung des Wachstums der Test-Organismen durch Auszählen von Kolonien, Trübungsmessungen, Nephelometrie etc. zugrunde. Diese Meßverfahren erfordern die Kultivierung großer Mengen von Mikroorganismen, so daß verlässliche Messungen erst nach

- 2 -

einem Zeitraum von 16 bis 72 Stunden durchgeführt werden können. Demgegenüber erlaubt das im folgenden beschriebene Verfahren die Auswertung von Meßergebnissen bereits nach weniger als 2 Stunden.

Natürlich vorkommende zur Biolumineszenz fähige Mikroorganismen sind nach Resistenz-Adaption im Labor zum Nachweis bestimmter Toxine eingesetzt worden (PCT/US84/01217); dieses Verfahren weist jedoch einige Nachteile auf, welche einen generellen Einsatz dieser Methode nicht erwarten lassen:

1. Natürlich vorkommende biolumineszierende Mikroorganismen sind marinen Ursprungs und benötigen deshalb eine hohe Ionenstärke im Testmedium. Die Herstellung der erforderlichen Osmolarität bedeutet einen möglicherweise verfälschenden Eingriff in die Messung.
2. Die Adaption dieser Mikroorganismen an bestimmte Substanzen durch wiederholte Selektion im Labor ist aufgrund der statistischen Seltenheit eines nützlichen Mutationsereignisses sehr zeitaufwendig, oder
3. sogar unmöglich.
4. Die Verwendung von natürlicherweise biolumineszierenden Bakterien schließt die Anwendung des Meßprinzips für etablierte und international standardisierte Tests aus, die den Gebrauch eines definierten Bakterienstammes vorschreiben.

### Beschreibung der Erfindung

Die hier beschriebene Erfindung macht sich die Methoden ex-

- 3 -

perimenteller Genetik zunutze, um prinzipiell jeden gewünschten Bakterienstamm durch Einführung eines speziell konstruierten Plasmid-Vektors (pGL3, s.u.) in einen zur Biolumineszenz befähigten Organismus zu verwandeln. Während das Prinzip der Transformation eines Bakterienstammes mit einem plasmid-inkodierten Luciferase LUX-Gen bereits beschrieben wurde (US-PS 4 581 335), stellt die vorliegende Erfindung eine entscheidende Verbesserung dar: Die Expression des LUX-Gens und damit die Fähigkeit zur Biolumineszenz ist nicht mehr permanent (konstitutiv), sondern in einer temperaturabhängigen Art und Weise an- und abschaltbar. Die Eigenschaft der Regulierbarkeit wird durch Konstruktion eines Plasmid-Vektors erreicht, der sowohl den Luciferase-Gen-Komplex von *Vibrio Harveyi* (LUX-Gene A und B), als auch das C<sub>I857</sub>-Allel des Phagen Lambda Repressorgens (thermolabiles Genprodukt!) enthält. Die durch diese Konzeption erreichte induzierbare Biolumineszenz hat verglichen mit permanent Licht emittierenden Testorganismen zwei wichtige Vorteile:

1. Das Signal- zu Rauschverhältnis der Einzelmessung wird verbessert.
2. Der für das Bakterium energetisch aufwendige Prozeß der Lichtemission kann auf den kurzen Meßzeitraum beschränkt werden; dies hat zur Folge, daß auch schlecht wachsende Organismen eingesetzt werden können, die durch permanente Biolumineszenz in ihrem Wachstum besonders beeinträchtigt würden, für Tests aber gerade aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit interessant sind.

Ein weiteres Charakteristikum der erfindungsgemäßen Entwicklung ist die Möglichkeit zur Einführung von zusätzlicher Resistenz- oder Hypersensitivität gegenüber spezifischen Toxi-

- 4 -

nen vermittelnden Genen in den skizzierten Plasmid-Vektor; dies wird durch molekulare Klonierung eines entsprechenden Gens in vorhandene spezifische Restriktions-Endonuklease-Schnittstellen ermöglicht.

Bisher wurde die Einführung verschiedener Antibiotika-Resistenzgene (z.B. Tetrazyklin) in Plasmid pGL3 erfolgreich durchgeführt. Mikroorganismen, die mit Genen ausgestattet sind, welche eine a priori festgelegte, spezifische Reaktivität gegenüber einer toxischen Substanz aufweisen (z.B. Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Tetrazyklin), können schließlich zur Identifikation und Konzentrationsabschätzung der fraglichen Substanz im Testmedium eingesetzt werden.

Weitere Vorteile der hier vorgestellten Entwicklung sind, daß

1. Meßergebnisse mit etwa zehnfach geringerem Zeitaufwand als durch konventionelle mikrobiologische Kultivierungs- und Meßmethoden zustande kommen und
2. prinzipiell jeder geeignete, empfohlene oder in standardisierten Referenztests vorgeschriebene Bakterienstamm für Biolumineszenz-Messungen eingerichtet werden kann.

Als Beispiel eines Bakterienstammes, der zu letzterer Kategorie zählt, sei E.coli ATCC 25922 angeführt; dieser Stamm ist der offizielle (WHO) Referenzstamm für standardisierte Antibiotika-Hemmhoftests. E. coli ATCC 25922 und andere in klinischen und industriellen Tests häufig eingesetzten Stämme (E. coli K- und B; chi 1776 etc.) sind von der Anmelderin durch Einführung des Plasmids pGL3 erfolgreich in zur Biolumineszenz fähige Spezies überführt worden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die hier vorgestellte



Toxizitäts-Testung vermittelt Licht emittierender Mikroorganismen gegenüber herkömmlichen Meßmethoden eine Weiterentwicklung darstellt, welche die folgenden Vorteile in sich vereint:

1. Biologische Relevanz.
2. Hohe Geschwindigkeit.
3. Bei geeigneter Konstruktion des Klonierungs-Vektors Spezifität gegenüber bestimmten Substanzen und dadurch die Möglichkeit zu deren Identifikation und Konzentrationsabschätzung.
4. Jede durch das LUX-Plasmid transformierbare Spezies ist als Indikator-Organismus einsetzbar, was eine erhebliche Ausweitung möglicher Anwendung bedeutet.
5. Biolumineszenz-Messungen sind mit geringem apparativen Aufwand durchzuführen, deshalb kostengünstig und
6. unter "Feldbedingungen", d.h. dezentral, durchzuführen.

#### Funktionsweise von Plasmid pGL3 im Vergleich mit LUX-Genkonstruktionen des Standes der Technik

Die molekulare Klonierung der LUX-Genkomplexe verschiedener mariner Bakterien sowie deren Transfer in normalerweise nicht zur Biolumineszenz befähigte Mikroorganismen ist sowohl in der wissenschaftlichen als auch in der Patentliteratur beschrieben (US-PS 4 581 335; EP 0168933). Bei diesen Dokumentationen handelt sich um Plasmid-Vektoren, die LUX-Gene entweder kon-

- 6 -

stitutiv durch ihren ursprünglichen Promotor oder unter Kontrolle des Beta-Galaktosidase-(lac Z-) Gen Promotors von E. coli exprimieren. Plasmid pGL3 hingegen

1. transkribiert den Luciferase-Genkomplex unter der Kontrolle des  $P_{RM}$ -Promotors des Phagen Lambda,
2. enkodiert gleichzeitig das  $C_I$ -Repressorgen des Phagen-Lambda, dessen Genprodukt der sog. Lambda-Repressor, den  $P_{RM}$ -Promotor negativ reguliert,
3. die Regulation erfolgt durch Verwendung des Allels 857 des Lambda-Repressors in temperaturabhängiger Weise.

Durch Erhöhung der Temperatur auf über 37°C wird das Repressorprotein inaktiviert, der LUX-Genkomplex zur Transkription in mRNA freigegeben, woraus schließlich eine um mehr als drei Zehnerpotenzen erhöhte Biolumineszenz-Aktivität des Indikatororganismus resultiert. Der Unterschied in der Größe des Biolumineszenzsignals zwischen reprimiertem und transkribiertem Zustand des LUX-Genkomplexes - und damit das Signal-zu Rauschen-Verhältnis der Messungen - ist bei Testorganismen, die mit pGL3 ausgestattet sind, um mehr als eine Zehnerpotenz besser als bei solchen, welche durch chemische Induktion des lacZ-Gens zur Biolumineszenz angeregt werden (vgl. US-PS 4 581 335). Der Grund für diese Eigenschaft von pGL3 liegt darin, daß der Lambda  $P_{RM}$ -Promotor, der die Expression der LUX-Gene reguliert, einerseits einen der stärksten, in E. coli funktionstüchtigen, prokaryontischen Promotoren darstellt, zum anderen aber im reprimierten Zustand etwa eine Zehnerpotenz "dichter" geschlossen ist als alle bisher bekannten bakterieneigenen Promotoren. Diese fast absolute Unterdrückung der Biolumineszenz durch pGL3 im reprimierten

Zustand der LUX-Gene, d.h. bei Inkubationen unter 35°C, ist eine wichtige Voraussetzung, auch sehr fragile Mikroorganismen für Biolumineszenzmessungen einzusetzen: Der das ohnehin mäßige Wachstum solcher Bakterien durch zusätzlichen Energieverbrauch stark beeinträchtigende Prozeß der Biolumineszenz kann so auf den kurzen Meßzeitraum eingeschränkt werden.

### Beschreibung einzelner Aspekte der Entwicklung

#### I. Konstruktion des Plasmid-Vektors pGL3

Das für die Erzeugung regulierbarer Biolumineszenz in Mikroorganismen konzipierte Plasmid pGL3 wurde durch Anwendung gängiger molekularbiologischer Klonierungstechniken konstruiert; es enthält:

1. den Luciferase-Genkomplex (LUX A; LUX B) von *Vibrio Harveyi*,
2. den PL-Promotor des Bakteriophagen Lambda,
3. das Lambda C<sub>I857</sub>-Repressorgen unter Kontrolle des
4. P<sub>R</sub>-Promotors des Bakteriophagen Lambda,
5. ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin,
6. incl. seines Promotors und
7. eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Pst 1.

Der LUX-Genkomplex ist 3', d.h. "hinter" den P<sub>RM</sub>-Promotor kloniert und wird deshalb von diesem transkribiert; der P<sub>RM</sub>-Pro-

motor seinerseits wird negativ vom Genprodukt des  $C_I$ -Gens - dem Lambda-Repressor - kontrolliert; dieser Lambda-Repressor wird zwar durch konstitutive Expression des  $P_R$ -abhängigen  $C_I$ -Gens immer in ausreichender Menge synthetisiert, ist aber durch Verwendung des  $C_{I857}$ -Allels hitzelabil. So bleibt der  $P_{RM}$ -Promotor durch Bindung des Repressors solange blockiert, bis durch 5- bis 15minütige Temperaturerhöhung auf 37° bis 42°C das Repressor-Protein denaturiert wird und vom  $P_{RM}$ -Promotor abfällt. An den freien Promotor bindet dann die DNA-abhängige RNA-Polymerase und bewirkt die massive Transkription des LUX-Genkomplexes. Insgesamt führt diese Konstruktion von pGL3 zu einer regulierbaren, da temperaturabhängigen Synthese des Enzyms Luciferase, welches für die Biolumineszenz der Indikatororganismen verantwortlich ist.

Die Konstruktionsbasis von pGL3 ist das Plasmid pLK915 (s. K. K. Stanley, und J. P. Luzio, EMBO J. 3: 1429 bis 1434, 1984). In die Bam HI Restriktions-Schnittstelle von pLK915 wurde ein 3,1 Kilobasenpaare großes Sal I-Bam HI Restriktionsfragment aus dem Genom von Vibrio Harveyi, das den kompletten Luciferase-Genkomplex (allerdings ohne Promotor) enthält, durch molekulare Klonierung eingefügt; Kompatibilität der Sal I Schnittstelle mit Bam HI wurde durch vorheriges Anligieren des 45 Basenpaare langen Bam HI - Sal I- Restriktionsfragments aus der Polylinkerregion des Plasmides "pBlue-script" (Firma "STRATAGENE"; San Diego, Cal., USA) an das Sal I-Ende und anschließender Restriktionsspaltung mit dem Enzym Bam HI hergestellt. Zuletzt wurde ein Oleonukleotid mit der Länge von 16 Basenpaaren, welches Translations-Stoppssignale in allen 3 Leserastern enthält (Firma Pharmazia, Schweden), in die Sma I-Schnittstelle des Bam HI-Sal I Polylinker-Fragments einkloniert, um jegliche Proteintranslation oberhalb, d.h. 5', des LUX-Genkomplexes auszuschließen.

## II. Herstellung, Aufbewahrung und Handhabung transformierter Mikroorganismen

Das oben beschriebene Plasmid pGL3 kann durch Standardtechniken in prinzipiell jede gewünschte Spezies von Mikroorganismen eingeführt werden, um schließlich in großen Mengen kultiviert zu werden. Es ist möglich, Bakterien als Glycerinkulturen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder nach Gefriertrocknung bei Umgebungstemperatur aufzubewahren. Die Gefriertrocknung wird entweder in Glasampullen oder speziell angefertigten Kunststoffbehältern durchgeführt, die z.B. in zwei voneinander abgetrennten Kammern die lyophilisierten Mikroorganismen bzw. die Komponenten für das zur Revitalisierung der Bakterien notwendige Nährmedium enthalten. Um Messungen toxischer Substanzen in einer Gasphase durchzuführen, ist die permanente Trennung der Indikatororganismen von einem Meßkompartiment durch eine für Wasserdampf impermeable Membran vorgesehen. Auf diese Weise wird die konstante Zusammensetzung des Wachstumsmediums und damit auch die Messung über eine längere Meßperiode, wie für Toxizitätstests von Gasen erforderlich, gewährleistet.

## III. Anwendung des Verfahrens

Um das beschriebene Biolumineszenz-Toxizitätsmeßverfahren dezentral einsetzen und automatisieren zu können, ist das Aufbringen der lyophilisierten Indikatororganismen auf ein geeignetes Trägermaterial in Form eines Teststreifens eine bevorzugte Anwendungsform. Bei diesem Verfahren werden die Mikroorganismen in definierter Menge auf die Trägermatrix aufgebracht, durch ein Spezialverfahren fixiert, gefriergetrocknet und schließlich als Teststreifen versiegelt. Vor der Durchführung der Biolumineszenz-Tests werden die Indikatorbakterien durch ein- bis zweistündige Inkubation in wässrigem Nährmedium bei

Umgebungstemperatur revitalisiert.

Das Meßprinzip der hier beschriebenen Toxizitätstestung beruht auf der Anwendung eines Zweischnitt-Verfahrens:

Zunächst wird ein "screening" mit einer Reihe verschiedener Testorganismen definierter Empfindlichkeit zum Nachweis genereller Toxizität in einer Probe durchgeführt. Danach können weitere Nachweisreaktionen mit Stämmen, die mit einer bestimmten, genetisch vorhandenen bzw. durch Transformation eingeführten Eigenschaft der Resistenz bzw. (Hyper-)Sensitivität ausgestattet sind, durchgeführt werden. Ein Toxin, gegen das ein Stamm spezifisch resistent ist, wird bei diesem zu einem nicht- oder nur partiell reduzierten Biolumineszenz-Signal führen; demgegenüber ist ein nicht resistenter Kontrollstamm gravierender in seiner Lebensfähigkeit und, damit korreliert, der Fähigkeit zur Biolumineszenz beeinträchtigt. Das Meßverfahren gemäß der Erfindung ist also einerseits dazu geeignet, das Maß generell vorhandener Toxizität einer Probe durch das Wachstumsverhalten von Mikroorganismen zu erfassen, andererseits ist es darüber hinaus möglich, alle Substanzen, gegenüber welchen eine spezifische Reaktivität bestimmter Testorganismen besteht, zu identifizieren und deren Konzentration näherungsweise einfach und schnell zu bestimmen.

#### IV. Durchführung eines Toxizitätstests

##### IV. 1 Nachweis genereller Toxizität in einer wässrigen Probe mit Hilfe verschieden sensibler Indikatorstämme

Ein Aliquot (0,01 bis 1 ml) einer Suspension je eines Indikatorstammes in flüssigem Nährmedium wird mit dem gleichen Volumen (etwa  $10^3$  bis  $10^7$  Zellen) der zu testenden Probe flüs-

sigkeit versetzt, gemischt und 1 bis 60 min bei 10° bis 34°C inkubiert. Danach wird durch 5- bis 15minütige Erwärmung der Probe auf 37° bis 42°C die Transkription des LUX-Genkomplexes und dadurch die Biolumineszenz in den Mikroorganismen initiiert. Die Messung der Lichtsignale erfolgt in einem geeigneten Lumineszenz-Photometer entweder als Endpunkt- oder als kontinuierliche Messung über einen Zeitraum von 1 bis 60 Minuten. Das Maß genereller Toxizität in einer Testflüssigkeit wird bestimmt durch das abnehmende Biolumineszenz-Meßsignal verschiedener Indikatorstämme im Vergleich untereinander wie mit einer Kontrolle, deren Nährmedium keine Probenflüssigkeit zugesetzt wurde.

#### IV. 2 Identifikation spezifischer Substanzen

Wie unter IV. 1 beschrieben, werden Indikator-Organismen - diesmal jedoch ausgestattet mit spezifischer Resistenz oder Sensitivität gegenüber bestimmten toxischen Substanzen - mit der Probenflüssigkeit inkubiert, um schließlich Biolumineszenz-Messungen durchzuführen. Ist das Biolumineszenz-Signal nur bei einem der Testorganismen unverändert, etwa in der Höhe des Kontrollwertes, während alle anderen Mikroorganismen eine Reduktion meßbarer Biolumineszenz erfahren, so ist jenes Toxin, gegen welches der betreffende Stamm resistent ist, identifiziert.

#### V. Anwendungsbeispiel 1

Das in Abbildung 2 gezeigte Beispiel verdeutlicht die Anwendung der hier vorgestellten Meßmethode zur Testung von Antibiotika-Konzentration in roher Milch:

Ein Stamm des gram-negativen Bakteriums E. coli ATCC 25922 wurde mit einem Plasmid [(pGL3.T, das zusätzlich zu den Kom-

ponenten von pGL3 (s.o.) ein Tetrazyklin-Resistenzgen enthält (Stamm "T" in Abb. 2)] transformiert. Als Kontroll-Stamm (Stamm "C") wurde ein Derivat von ATCC 25922 - ausgestattet mit pGL3 - verwendet. Mehrere 0,5 ml-Proben roher Milch mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Tetrazyklin wurden mit je 0,1 ml (etwa  $2 \times 10^6$  Bakterien) Suspensionen der Stämme C und T versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10minütiger Erwärmung der Kulturen auf 40°C zur Induktion der Biolumineszenz wurden 0,01 ml einer 0,1prozentigen Lösung des Aldehyds Decanal als Substrat der Luciferase zugesetzt und die Proben in einem Lumineszenz-Photometer über einen Zeitraum von 50 Minuten in 4-Minuten-Intervallen gemessen. In Abbildung 2 sind die Meßergebnisse von Proben mit fünf verschiedenen Antibiotikakonzentrationen als relative Lichtsignale (RLU; Ordinate) als Funktion der Zeit aufgetragen.

Das Biolumineszenzsignal des tetrazyklin-resistenten Stammes T ist über den Meßzeitraum relativ konstant, während Stamm C ein Abnehmen der emittierten Lichtmenge in einer konzentrationsabhängigen Weise erkennen läßt. Die Tatsache, daß die Wachstumseigenschaften des Indikator-Stammes T durch Tetrazyklin nicht wesentlich beeinträchtigt werden, ermöglicht seine Anwendung auch zur Identifikation dieses Antibiotikums in Proben (z.B. Milch) unbekannter Herkunft. Die Bestimmung absoluter Konzentrationen dieses Antibiotikums, oder anderer toxischer Substanzen, gegen die ein Indikatorstamm spezifisch resistent ist, ist in guter Näherung durch Einbeziehen von Referenzwerten bekannter Konzentration des Toxins in die Meßreihe möglich.

#### VI. Weitere Anwendungen des Verfahrens

Das oben angeführte Beispiel erläutert nur eine der möglichen



Anwendungen des hier vorgestellten Toxizitäts-Meßverfahrens mittels Biolumineszenz. Analog ist die Toxizitätsbestimmung flüssiger Proben im Hinblick auf deren Belastung mit anderen Antibiotika, Schwermetallen, Fluorchlorkohlenwasserstoff-Verbindungen (FCKW) wie Dioxinen, PCB etc. durchzuführen, vorausgesetzt, daß mit entsprechenden Resistenz- bzw. Hypersensitivitäts-Genen ausgestattete Mikroorganismen zur Verfügung stehen.

Effekte toxischer Substanzen in gasförmiger Umgebung können in ähnlicher Weise - wie im Beispiel für flüssige Proben beschrieben - erfaßt werden. Bei dieser Anwendungsform bringt man die gasförmige Probe über eine nur für Gase, nicht aber für Wasserdampf, durchlässige Membran in Kontakt mit den Indikator-Organismen. Diese Meßanordnung erlaubt die Erfassung toxischer Substanzen in der Gasphase über längere Meßzeiten, ohne daß durch Verdunstung von Wasserdampf das Nährmedium der Testbakterien in seiner Zusammensetzung verändert wird.

\*\*\*\*\*

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Nachweis toxischer Substanzen in flüssiger oder gasförmiger Umgebung mit Hilfe von Mikroorganismen definierter genereller oder spezifischer Resistenz bzw. (Hyper)Sensitivität gegenüber toxischen Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Indikator-Stämme

- (I) natürlich vorkommen,
- (II) durch Selektion im Laboratorium an ein bestimmtes Toxin adaptiert werden, oder
- (III) durch molekularbiologische Techniken mit einem Resistenz bzw. Hypersensitivität gegenüber einem bestimmten Toxin vermittelndem Gen ausgestattet sind und
- (IV) alle Mikroorganismen durch Transformation mit einem bakteriellen Luciferase-Genkomplex die Eigenschaft zur Biolumineszenz erhalten haben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das mit pGL3 bezeichnete Plasmid folgende Konstruktionsmerkmale aufweist:

- (I) den LUX-Genkomplex von *Vibrio Harveyi*,
- (II) ein bestimmtes Allel des Lambda-Phagen-Repressorgens  $C_I$  unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors,  $P_R$ ,
- (III) ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin,
- (IV) eine Restriktionsenzym-Schnittstelle, die die Option der Einführung eines zusätzlichen Gens durch Klonierung in pGL3 bietet,
- (V) den Lambda-Phagen  $P_{RM}$ -Promotor, unter dessen Kontrolle der Luciferase-Genkomplex transkribiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der  $P_R$ -Promotor unter der Kontrolle des

hitzelabilen Genproduktes des Lambda-Phagen-Repressorgens C<sub>I</sub>857 steht; das Repressorprotein durch Erwärmen auf über 37°C für etwa 5 bis 15 Minuten inaktiviert werden kann, woraus das Phänomen temperaturinduzierbarer Biolumineszenz resultiert.

4. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß das Vorhandensein einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Pst 1 die Möglichkeit bietet, ein zusätzliches Resistenz oder Hypersensitivität gegen eine bestimmte Substanz vermittelndes Gen durch molekulare Klonierung einzuführen.
5. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß dabei toxische Effekte von Antibiotika, Schwermetallen, Enzyminhibitoren, Pestiziden, mikrobiellen Toxinen, flüchtigen Kohlenwasserstoffverbindungen (FCKW), Desinfektionsmitteln, Konservierungsstoffen oder anderen Substanzen mit cytotoxischen Eigenschaften ausgeübt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß die generelle Toxizität einer Probenflüssigkeit getestet wird, indem man einen durch genetische Manipulation zur Biolumineszenz befähigten Stamm von Indikator-Mikroorganismen dieser Flüssigkeit aussetzt und eine Reduktion des Biolumineszenz-Signals im Gegensatz zu Kontrollmessungen ohne Zusatz der zu testenden Probenflüssigkeit feststellt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß die Identifikation einer bestimmten toxischen Substanz durch Vergleich der Absterberaten eines sensitiven mit einem gegen das betreffende Toxin spezifisch resistenten Indikator-Organismus vorgenommen wird: Die Licht-

- 16 -

emission der nicht spezifisch resistenten Kontrollorganismen ist reduziert, während ein konstantes Biolumineszenz-Signal zur Identifikation derjenigen Substanz führt, gegen die der Organismus spezifisch resistent ist.

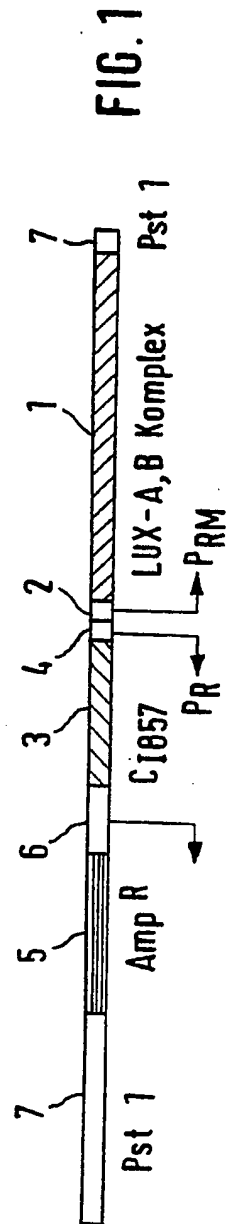
8. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß man die Konzentration einer toxischen Substanz durch Messung der Absterbekinetik oder Änderung im Metabolismus von zur Biolumineszenz fähigen Indikatororganismen, die dieser Substanz über den Meßzeitraum ausgesetzt werden, bestimmt, indem man die Abnahme der Biolumineszenz-Signale dieser Messungen mit Kontrollen vergleicht, in denen bekannte Konzentrationen der Testsubstanz auf die Indikator-Organismen einwirken.

9. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß man die Mikroorganismen lyophilisiert, durch ein Spezialverfahren auf eine Trägermatrix aus Papier oder einem synthetischen Material aufbringt und in einem speziellen Behältnis aufbewahrt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß der Testbehälter durch eine Membran in zwei Kompartimente getrennt wird, so daß zwar Gase, nicht aber Wasserdämpfe, in das Kompartiment mit den Mikroorganismen aus dem flüssigen Nährmedium der Testbakterien in den Gasraum übertreten können.

\*\*\*\*\*

- 1/2 -



- 2/2 -

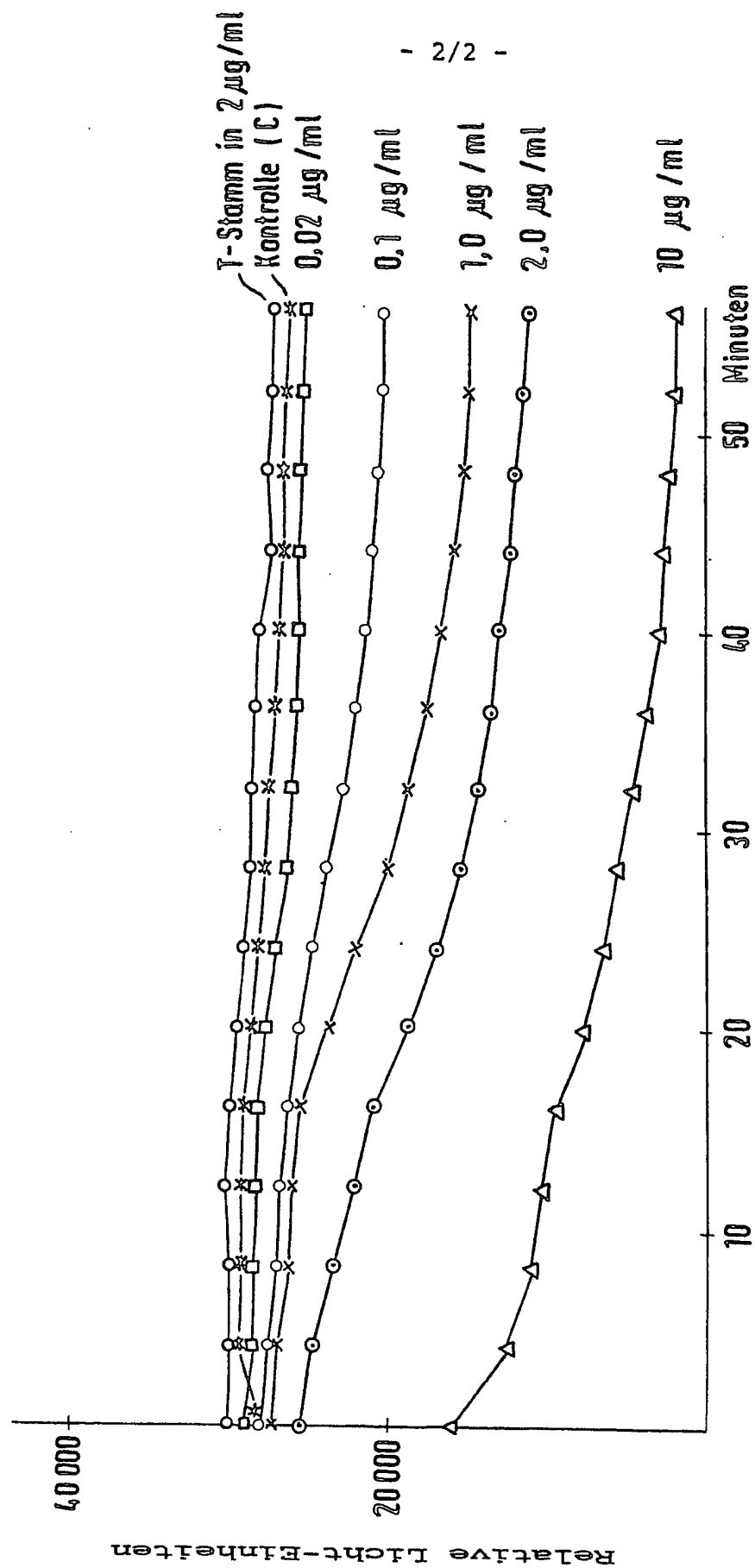


FIG. 2

ERSATZBLATT,

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5 C12Q 1/18 , 1/66		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl.5	C12Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *</b>		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
Y	US, A, 3370175 (ALBERT L. JORDON ET AL) 20 February 1968, see figure 2, lines 2 and 3 ---	1-S0
Y	DE, A, 284896 (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 29 March 1979 see figure 2 ; the example ---	1-10
Y	US, A, 4581335 (THOMAS O. BALDWIN) 8 April 1986 see page 2, column 3, lines 39-63 ---	1-10
Y	Dialog Information Services, File 55, BIOSIS BIOSIS number 84024973, Leemans R et al: "A broad-host-range expression vector based on the pl promoter of coliphage lambda regulated synthesis of human interleukin 2 in erwini and serratia species", J Bacteriol 169 (5), 1987, 1899-1904 ---  .../...	1-10
<p>* Special categories of cited documents: **</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
12 December 1989 (12.12.89)	8 January 1990 (08.01.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	Dialog Information Services, Files 55, Biosis, BIOSIS number 81081249 ; Lastick S M et al "Overproduction of escherichia-coli xylose isomerase" Biotechnol Lett 8(1) 1986, 1-6	1-10
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH , INC) 28 January 1988 see the whole document	1-10
-----		



ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

PCT/DE 89/00626

SA

31415

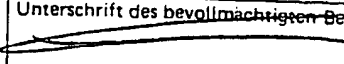
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/11/89  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 3370175	20/02/68	NONE	
DE-A1- 2841896	29/03/79	BE-A- 870833	15/01/79
		GB-A-B- 2005018	11/04/79
		NL-A- 7809821	30/03/79
		FR-A-B- 2404847	27/04/79
		JP-A- 54058492	11/05/79
		CA-A- 1103050	16/06/81
		SE-A- 7810154	29/03/79
US-A- 4581335	08/04/86	KEINE	
WO-A1- 88/00617	28/01/88	AU-D- 77516/87	10/02/88
		EP-A- 0274527	20/07/88

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 89/00626

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup> Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 5 C 12 Q 1/18, 1/66		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. 5	C 12 Q	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
Y	US, A, 3370175 (ALBERT L. JORDON ET AL) 20 Februar 1968, Sehen Sie vor allem fig 2, seiten 2 und 3.	1-10
--		
Y	DE, A1, 2841896 (BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) 29 März 1979, Sehen Sie vor allem figur 2, die Beispiele.	1-10
--		
Y	US, A, 4581335 (THOMAS O. BALDWIN) 8 April 1986, Sehen Sie seite 2, kolumne 3 Zeilen 39-63.	1-10
--		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
12. Dezember 1989		08.01.90
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		 T.K. WILLIS

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>Dialog Information Services, File 55, BIOSIS, BIOSIS number 84024973, Leemans R et al: "A broad-host-range expression vector based on the pl promoter of coliphage lambda regulated synthesis of human interleukin 2 in erwini and serratia species", J Bacteriol 169 (5), 1987, 1899-1904</p> <p>--</p>	1-10
Y	<p>Dialog Information Services, File 55, BIOSIS, BIOSIS number 81081249, Lastick S M et al: "Overproduction of escherichia-coli xylose isomerase", Biotechnol Lett 8 (1), 1986, 1-6</p> <p>--</p>	1-10
A	<p>WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28 Januar 1988 Ganzes Dokument</p> <p>--</p> <p>-----</p>	1-10

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

PCT/DE 89/00626

SA 31415

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 08/11/89  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A- 3370175	20/02/68	KEINE	
DE-A1- 2841896	29/03/79	BE-A- 870833	15/01/79
		GB-A-B- 2005018	11/04/79
		NL-A- 7809821	30/03/79
		FR-A-B- 2404847	27/04/79
		JP-A- 54058492	11/05/79
		CA-A- 1103050	16/06/81
		SE-A- 7810154	29/03/79
US-A- 4581335	08/04/86	KEINE	
WO-A1- 88/00617	28/01/88	AU-D- 77516/87	10/02/88
		EP-A- 0274527	20/07/88

EPO FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtslatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82